
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

DORIANO CAVALLINI, ROBERTO SCANDURRA, ERMINIA
BARBONI, MIRELLA MARCUCCI

**Sul meccanismo di riduzione delle cobalamine con i
tioli**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 45 (1968), n.5, p. 390–398.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_45_5_390_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Chimica biologica. — *Sul meccanismo di riduzione delle cobalamine con i tioli* (*). Nota di DORIANO CAVALLINI, ROBERTO SCANDURRA, ERMINIA BARBONI e MIRELLA MARCUCCI, presentata (**) dal Socio A. ROSSI-FANELLI.

SUMMARY. — The cobalt atom of cobalamins is reduced by cysteamine and other thiols at alkaline pH. The reduction is avoided when the solution of cobalamin is passed through a chelating resin. The addition of a trace of Cu^{++} ions to the solution of cobalamin passed through the chelating resin regenerates the reduction of cobalt by the thiols. This result indicates that the reduction of cobalamins by thiols should be mediated by a trace of metal present as an impurity in the cobalamin.

È stato recentemente osservato che l'ossidazione dei tioli può essere catalizzata dalle cobalamine a pH alcalini. Peel [1] riferisce che una miscela di $\text{B}_{12}\text{—CN}$ (1) o di B_{12a} e di tioglicolato a pH alcalino, cambia di colore dal rosa al bruno arancio e che il colore ritorna non appena la soluzione viene agitata all'aria. Il processo può essere ripetuto numerose volte ed il prodotto bruno arancio è la B_{12r} , mostrando così che la cobalamina può funzionare da catalizzatore nella ossidazione del tiolo. Diehl e Murie [2] riferiscono che omocisteina, cisteina e mercaptoetanololo, convertono, in assenza di O_2 , la B_{12a} in B_{12r} . Dubnoff [3] e Adler e coll. [4] hanno descritto un complesso a pH 7 tra B_{12a} e GSH affermando che, ad eccezione del complesso formato con il glutatione, i complessi con altri tioli riducono il Co della B_{12a} a pH alcalino formando B_{12r} .

Abbiamo voluto compiere un'indagine accurata sulla reazione dei tioli con le cobalamine, in quanto da un'analisi spettrofotometrica preliminare, avevamo rilevato che la reazione tra un tiolo, quale la cisteamina, e la B_{12a} a pH 7 ed in assenza di O_2 sembrava decorrere con un meccanismo assai più complesso di una semplice riduzione diretta della cobalamina a mezzo del tiolo. Come tiolo rappresentativo abbiamo usato nel presente lavoro la cisteamina ($\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—SH}$) ed abbiamo potuto dimostrare che la riduzione delle cobalamine non è diretta ma deve avvenire a mezzo di tracce di uno ione metallico presente come impurezza. Un breve riassunto di questi risultati è stato già pubblicato in altra rivista [6].

(*) Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 19 novembre 1968.

(1) Abbreviazioni: $\text{B}_{12}\text{—CN}$ = cianocobalamina; B_{12a} = idrossocobalamina o aquocobalamina, a seconda del pH; B_{12r} = cobalamina ridotta (Co^{++}); B_{12s} = idridocobalamina (Co^+); $\text{B}_{12}\text{—NH}_3$ = cobalicromo.

RSH = cisteamina; GSH = glutatione; EDTA = Etilendiaminatetracetato (versenato).

PARTE SPERIMENTALE.

Materiali. La B_{12a} era un prodotto Pierrel (Milano); la $B_{12}CN$ e l'ac. ascorbico, prodotti Merck (Darmstadt); la cisteamina un prodotto Bracco (Milano). La $B_{12}-NH_3$ era preparata nel seguente modo: un campione di B_{12a} purificata mediante elettroforesi a pH 2.7 in acido acetico 0.5 M veniva eluita con H_2O . Si fissava la B_{12a} su una colonna di Dowex 50 H^+ di cm 1×10 , si lavava con H_2O e quindi si eluiva con NH_3 1 N. L'eluato della colonna veniva liberato dall'eccesso di NH_3 a pressione ridotta.

Metodi. Per le analisi spettrofotometriche veniva usata una cuvetta di quarzo da 1 cm di cammino ottico, trasformata in Thunberg con due ampole laterali. Per gli esperimenti sulla formazione del complesso, si ponevano nella cuvetta: 0.09 μ mol di cobalamina in H_2O (determinata spettrofotometricamente a 522 m μ usando un $E = 8.0 \times 10^6$ cm²/mole) ed H_2O al volume di 2.5 ml. Nelle ampole laterali erano poste 0.45 μ mol di RSH in 0.3 ml H_2O e 100 μ mol di tampone al pH desiderato in 0.2 ml H_2O . Si faceva gorgogliare argon per 5', quindi si praticava il vuoto con una pompa ad acqua e si riempiva con argon: queste operazioni venivano ripetute tre volte lasciando alla fine una lieve sovrappressione di argon. Quindi si immetteva il tampone e si registrava lo spettro con uno spettrofotometro registratore DK2A logaritmico. A questo punto si immetteva la RSH e si registrava lo spettro ogni 5' fino a che non si avevano pi \dot{u} variazioni spettrali. Negli esperimenti di riduzione del complesso veniva usata la medesima tecnica, con le seguenti varianti. Poich \acute{e} il complesso, come illustrato pi \dot{u} avanti, ha un pH ottimale di formazione a 4.2, venivano introdotte 10 μ mol di tampone acetato a tale pH direttamente nella cuvetta mentre in un'ampolla laterale si ponevano 0.45 μ mol (oppure quantit \grave{a} variabili) di RSH in 0.3 ml H_2O , nell'altra 100 μ mol di tampone al pH desiderato in 0.2 ml H_2O . Il pH di questo ultimo tampone era scelto in modo da portare il pH della soluzione finale dopo il mescolamento al valore desiderato. Si operava come descritto in precedenza salvo che si aggiungeva prima l'RSH, si seguiva la formazione del complesso per 20' quindi si procedeva alla riduzione aggiungendo dall'ampolla laterale il tampone al pH desiderato. Gli spettri venivano registrati ogni 2' per i primi dieci minuti, quindi ogni 5' fino a 60'. Il tempo di registrazione da 4000 m μ fino a 270 m μ era in ogni caso di 52''.

Il blank conteneva H_2O , RSH e tamponi in un volume di 3 ml.

Il $Cu^{(II)}Cl$ era un prodotto commerciale purificato eliminando $Cu^{(II)}Cl_2$ mediante ripetuti lavaggi con HCl 0.1 N e quindi sciolto in KCl 0.25 M sotto Argon. La sua determinazione quantitativa \grave{e} stata effettuata mediante il dietilditiocarbammato dopo ossidazione a $Cu^{(II)}Cl_2$.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Come si pu \acute{o} notare dalla fig. 1, in cui sono riportate le curve spettrofotometriche ottenute dopo 20' dal contatto della cisteamina con la B_{12a} ai pH indicati, si ha la comparsa di uno spettro diverso da quello della B_{12a} solo ai pH

compresi tra 4 e 6. Tale spettro è simile a quello riportato da Adler e Coll. [4] e da Dubnoff [3] ed è da ritenere lo spettro del complesso B_{12a} -RSH. Lo spettro non si modifica apprezzabilmente tra valori di pH compresi tra 4 e 6

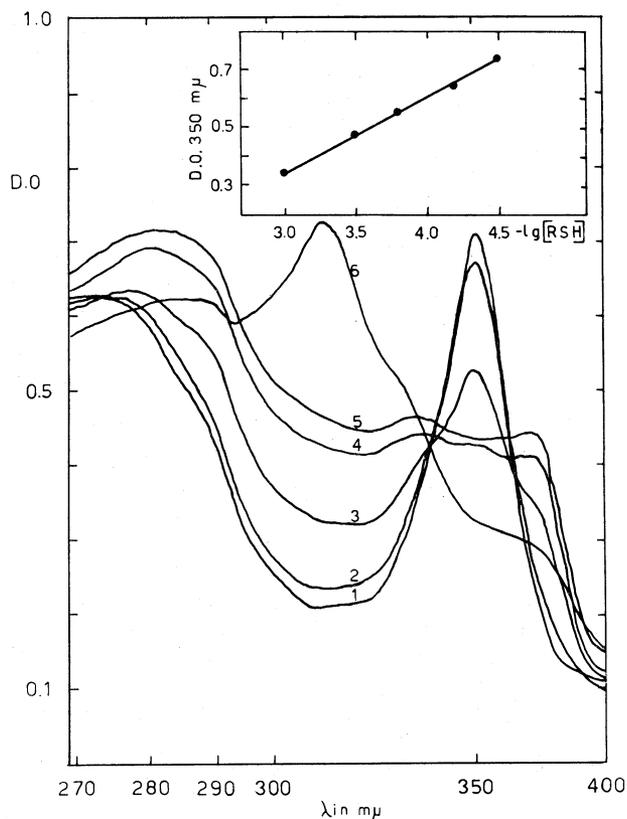


Fig. 1. - Effetto del pH sulla reazione della B_{12a} con la cisteamina (RSH). Gli spettri sono stati registrati 20' dopo l'aggiunta della RSH. Condizioni sperimentali descritte nel testo.

Ascisse = λ in $m\mu$; ordinate = D.O.

- 1: B_{12a} 3×10^{-8} M in H_2O .
- 2: B_{12a} 3×10^{-8} M + RSH $1,5 \times 10^{-4}$ M, pH 1.5
- 3: B_{12a} 3×10^{-8} M + RSH $1,5 \times 10^{-4}$ M, pH 2.6
- 4: B_{12a} 3×10^{-8} M + RSH $1,5 \times 10^{-4}$ M, pH 3.4
- 5: B_{12a} 3×10^{-8} M + RSH $1,5 \times 10^{-4}$ M, pH 4.2; 5.1; 6
- 6: B_{12a} 3×10^{-8} M + RSH $1,5 \times 10^{-4}$ M, pH 8.9.

Inserto: Effetto della concentrazione della RSH sulla formazione del complesso B_{12a} -RSH al pH ottimale di 4.2.

In ascisse: $-\log [RSH]$; in ordinate: D.O. a 350 $m\mu$ dopo 60' dall'aggiunta della cisteamina.

ed il pH ottimale per la sua formazione è risultato essere 4.2. Pertanto questo pH è stato scelto nelle indagini successive per la formazione del complesso. Il complesso non subisce variazioni spettrali nel tempo ed è caratterizzato da un picco a 370 e a 332 $m\mu$ e da avallamenti a 310 e 350 $m\mu$.

La concentrazione di RSH pari a 5 volte la concentrazione molare della B_{12a} , è stata scelta in quanto concentrazioni minori diminuivano troppo la velocità di formazione del complesso e concentrazioni maggiori, pur elevando questa velocità, producevano una inibizione sulla reazione successiva di riduzione del complesso. La formazione del complesso a pH tra 4 e 6 è indipendente dalla presenza o meno dell' O_2 .

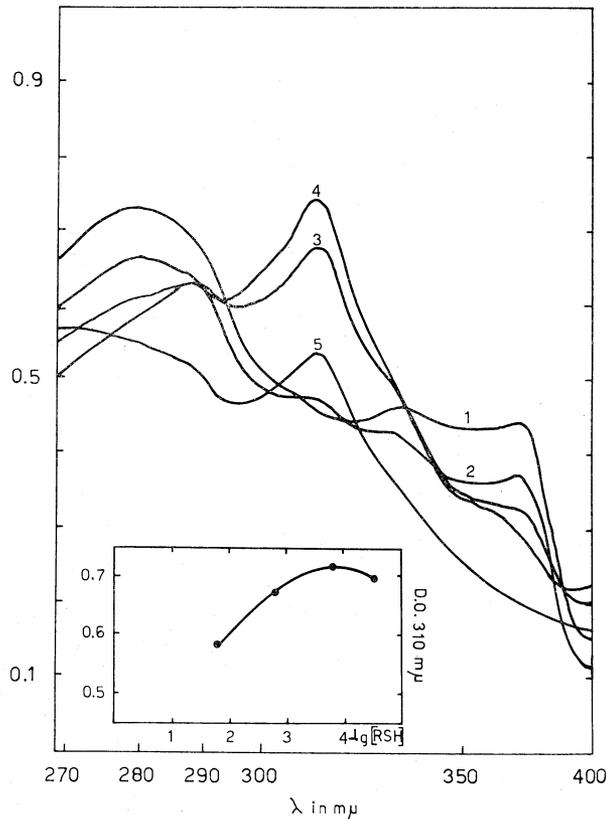


Fig. 2. - Effetto dell'aumento del pH sul complesso B_{12a} -RSH ottenuto a pH 4.2. Le registrazioni sono state effettuate 60' dopo l'aggiunta del tampone. Condizioni sperimentali descritte nel testo.

Ascisse: λ in $m\mu$; ordinate: D.O.

- 1: B_{12a} $3 \times 10^{-5} M$ + cisteamina $1.5 \times 10^{-4} M$, a pH 4.2
- 2: B_{12a} $3 \times 10^{-5} M$ + cisteamina $1.5 \times 10^{-4} M$, a pH 7.2
- 3: B_{12a} $3 \times 10^{-5} M$ + cisteamina $1.5 \times 10^{-4} M$, a pH 8.0
- 4: B_{12a} $3 \times 10^{-5} M$ + cisteamina $1.5 \times 10^{-4} M$, a pH 8.9
- 5: B_{12a} $3 \times 10^{-5} M$ + cisteamina $1.5 \times 10^{-4} M$, a pH 11.0.

Inserto: Effetto della concentrazione della cisteamina (RSH) sulla velocità di riduzione del complesso B_{12a} -RSH a pH 8.9.

Ascisse = $-\log [RSH]$; ordinate = D.O. 310 $m\mu$, determinate 30' dopo l'aggiunta del tampone a pH 8.9.

Una serie di indagini è stata eseguita trattando la B_{12a} con l'RSH in assenza di O_2 a pH 4.2 fino a stabile formazione del complesso ed elevando quindi il pH a valori maggiori mediante aggiunta di un appropriato tampone

come descritto nella parte sperimentale. L'alcalinizzazione provoca la scomparsa dei picchi a 370 e 332 m μ e la comparsa di un picco a 310 m μ , che è caratteristico della B_{12_r}. La velocità di riduzione, come mostrato in fig. 2 in cui sono riportati gli spettri ottenuti dopo 60' dall'aggiunta dei tamponi al complesso B_{12_a}-RSH, dipende dal pH. La velocità di riduzione aumenta con l'aumentare del pH fino a circa pH 9, per poi diminuire (fig. 3). A pH 8,9, la reazione di riduzione del complesso è risultata di pseudo primo ordine con costante $K = 6.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

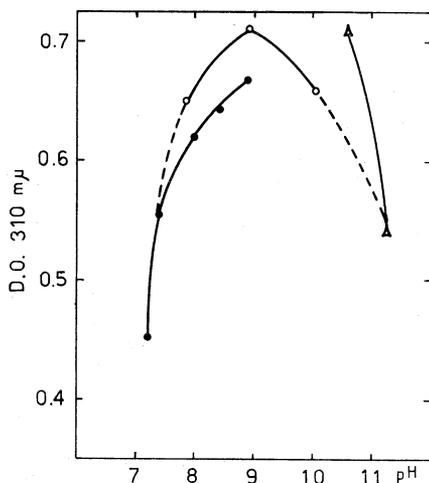


Fig. 3. - Effetto del pH sulla velocità di riduzione del complesso B_{12_a}-RSH.

In ascisse D.O. a 350 m μ determinate 30' dopo l'aggiunta dei seguenti tamponi: o—o Glicina-NaOH 0.033 M; ●—● in Tris-HCl 0.033 M; Δ — Δ in NaOH; in ordinate: unità di pH.

Esperimenti condotti con la B₁₂-CN e con la B₁₂-NH₃, hanno dimostrato che queste cobalamine nelle nostre condizioni non formano il complesso con l'RSH e non sono ridotte a pH alcalini. Ciò dimostra che i complessi con il cianuro e con l'NH₃ hanno stabilità più elevata di quelli con il gruppo tiolo.

La riduzione della B_{12_a} appare tuttavia assai più complessa di una semplice reazione tra R-SH e B_{12_a} come è mostrato dai seguenti esperimenti. Se alla miscela di reazione descritta sopra viene aggiunta una soluzione di EDTA la cui concentrazione finale sia $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, si ha ugualmente la formazione del complesso con l'R-SH ma questo non si riduce quando viene innalzato il pH del mezzo. Inoltre, se la soluzione di B_{12_a} viene passata su una colonna di resina chelante di Dowex A 1, essa forma ugualmente il complesso a pH 4.2 con l'R-SH, ma questo non si riduce più in ambiente alcalino, nelle condizioni anaerobiche già descritte. Questi due esperimenti dimostrano la necessità della presenza nella miscela di reazione di tracce di uno ione metallico che potrebbe costituire una impurezza delle soluzioni usate e che risulterebbe indispensabile alla reazione del tiolo con la cobalamina.

La B_{12a} è stata anche purificata mediante elettroforesi su carta in acido acetico 0.5M. Il composto eluito dalla carta forma anche in questo caso il complesso con l'RSH con le stesse modalità indicate per la B_{12a} . Anche questo però non si riduce più quando è portato in ambiente alcalino. Ciò si può spie-

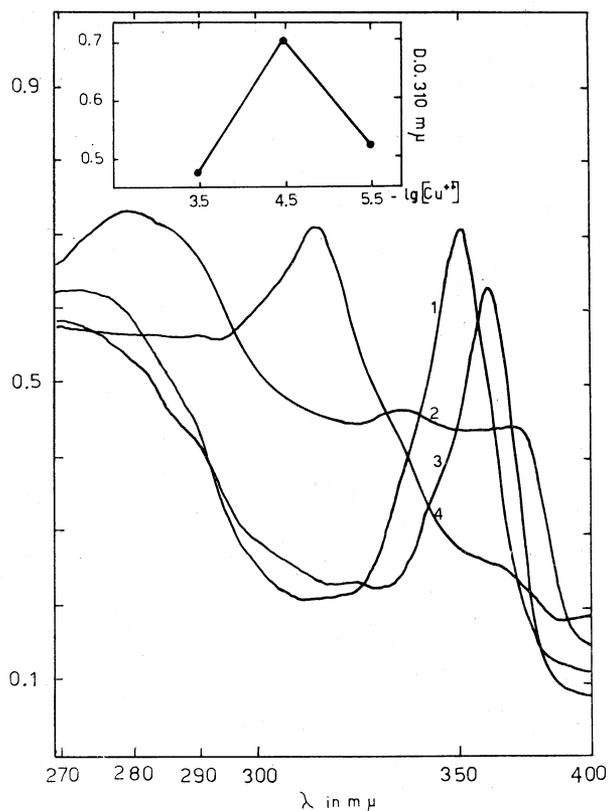


Fig. 4. - Effetto del Cu^{++} sulla B_{12a} passata su resina Chelex A_1 . Condizioni sperimentali descritte nel testo.

In ascisse = λ in $m\mu$; in ordinate = D.O.

- 1: B_{12a} 3×10^{-5} M a pH 4.2 in tampone acetato
- 2: B_{12a} -RSH a pH 4.2 dopo 20'
- 3: B_{12a} -glicina a pH 8.9, risultante dalla scissione del complesso B_{12a} -RSH.
- 4: Riduzione del complesso B_{12a} -RSH a pH 8.9 per aggiunta di una soluzione di Cu^{++} (conc. finale 3×10^{-5} M).

Inserto: Effetto della concentrazione di Cu^{++} sulla velocità di riduzione del complesso B_{12a} -RSH a pH 8.9 dopo passaggio delle B_{12a} su resina Chelex A_1 .

Ascisse = $-\log [Cu^{++}]$; ordinate = D.O. 310 $m\mu$ dopo 30' dall'aggiunta del tampone a pH 8.9.

gare ammettendo che anche mediante elettroforesi la B_{12a} viene privata dall'impurezza metallica necessaria alla riduzione. La riduzione del complesso tra la cisteamina e la B_{12a} passata sulla colonna di resina chelante o purificata mediante elettroforesi, viene ripristinata se alla miscela di reazione vengono aggiunte tracce di uno ione metallico come Cu^{++} . In fig. 4 è riportato l'effetto

dell'aggiunta del Cu^{++} sul complesso tra la B_{12a} passata per Dowex A 1 e la cisteamina. L'insero della fig. 4 indica inoltre che la velocità di riduzione è fortemente influenzata dalla concentrazione del Cu^{++} .

Alla luce dei risultati sopra riportati, la reazione della B_{12a} con i tioli deve essere interpretata nel modo seguente. A pH acidi compresi tra 4 e 6 si ha la formazione del complesso $\text{B}_{12a}\text{-RSH}$ la cui velocità di formazione dipende dalla concentrazione della cisteamina per cui la reazione è stata

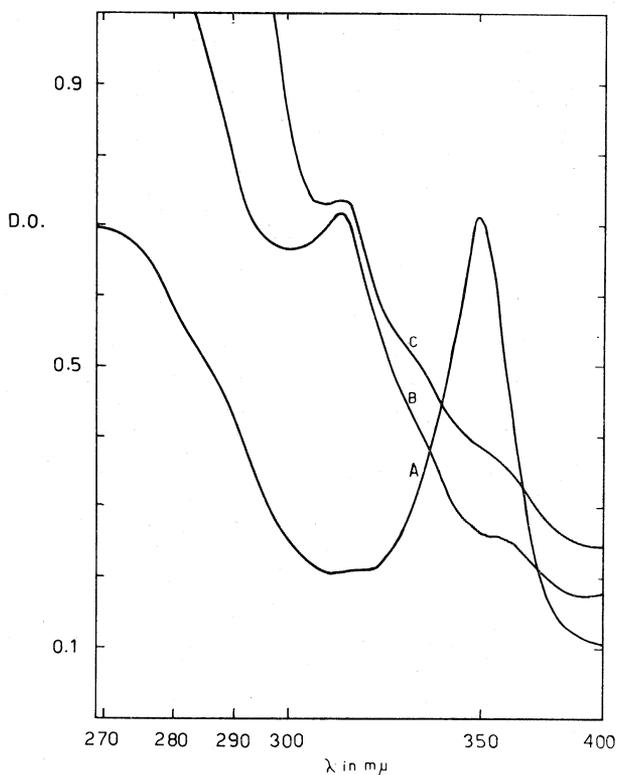


Fig. 5. - Effetto del $\text{Cu}^{(I)}\text{Cl}$ e dell'Acido Ascorbico sulla riduzione della B_{12a} .

In ascisse = λ in $\text{m}\mu$; in ordinate = D.O.

A = curva spettrofotometrica della B_{12a} 3×10^{-5} M in H_2O

B = curva spettrofotometrica della B_{12a} + $\text{Cu}^{(I)}\text{Cl}$ 6×10^{-5} M a pH 8.9 dopo 60'.

C = curva spettrofotometrica della B_{12a} + $\text{Cu}^{(II)}\text{Cl}_2$ 3×10^{-5} M + Ac. Asc. 15×10^{-5} M a pH 4.2 dopo 60'.

considerata di 2° ordine totale la cui K ha un valore di 0.72 litri/moli. $\times \text{sec}^{-1}$ alla temperatura di 25° C ed a pH 4.2. Il complesso in assenza di ioni metallici si scinde a pH alcalini dando lo spettro della idrossocobalamina che è simile a quello della acquocobalamina ma con λ_{max} a 355 $\text{m}\mu$ in presenza di NaOH, e quello del complesso B_{12a} -glicina in presenza del tempone glicina/NaOH, il quale ha un λ_{max} a 357 $\text{m}\mu$.

In presenza di tracce di ioni metallici, il complesso $\text{B}_{12a}\text{-RSH}$ viene ridotto a B_{12r} ($K = 3.8 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$) con contemporanea ossidazione della

cisteamina. Lo schema di reazione della B_{12a} con la cisteamina può quindi essere il seguente: se sono presenti tracce di metalli, esemplificati con il Cu^{++} , l'eccesso di tiolo riduce il metallo che a sua volta riduce la B_{12a} . In tal senso la riduzione della B_{12a} è indiretta e dipende dalla presenza di tracce di ioni metallici che funzionano da intermediari. Questa conclusione è avvalorata dalla Capacità del Cu^+ di ridurre direttamente la B_{12a} senza necessità della presenza del tiolo e dall'effetto analogo esercitato da altri riducenti del Cu^{++} come l'acido ascorbico. Aggiungendo ad una soluzione $3 \times 10^{-5} M$ di B_{12a} in assenza di O_2 ed a pH 8.9, del Cu^+ in concentrazione finale pari a $6 \times 10^{-5} M$, si ha la comparsa dello spettro B della fig. 5 che indica chiaramente la riduzione del Co^{+++} , la quale probabilmente è spinta fino a Co^+ data la sua analogia con lo spettro della B_{12} . [5]. Analoghi risultati (spettro C) si hanno per azione di una soluzione $15 \times 10^{-5} M$ di acido ascorbico in presenza di $Cu^{++} 3 \times 10^{-5} M$ a pH 4.2.

TABELLA I.

Valori di D.O. a 310 m μ ottenuti sottraendo al valore letto a 30' dall'aggiunta del tampone a pH 8.9 il valore del complesso B_{12a} -tiolo ottenuto a pH 4.2 dopo 20'.

TILOLO	D.O.
Cisteamina	0.2
Mercaptoetanolo	0.19
Cisteina	0.06
Glutatione	0.04

Sono stati saggiati con la medesima metodica descritta sopra, altri tioli quali il mercaptoetanolo, la cisteina, e il glutatione. In Tabella I sono riportate la velocità di riduzione a pH 8.9 dei complessi, ottenuti a pH 4.2 nel modo descritto, tra la B_{12a} ed i vari tioli indicati. I dati riportati confermano che il meccanismo descritto per la riduzione della B_{12a} ad opera della cisteamina, può essere esteso alla reazione generale dei tioli con la B_{12a} . Il glutatione mostra uno scarso effetto riducente, già constatato da Adler e coll. [4], sulla B_{12a} .

Dai risultati riportati sopra risulta evidente che la B_{12a} viene ridotta dai tioli con l'intervento di tracce di qualche metallo presente come impurezza nel campione di B_{12a} usata. Nei nostri esperimenti questo metallo, eliminato mediante passaggio della B_{12a} attraverso una resina chelante o mediante sua purificazione elettroforetica, è stato reintegrato con l'aggiunta di ioni rameici. Non sappiamo però quale sia il metallo realmente presente in tracce nella vitamina naturale, che permette la riduzione del Co a mezzo dei tioli.

Tentativi di mettere in evidenza nel nostro campione di B_{12a} qualche metallo mediante spettroscopia di assorbimento atomico non ha dato finora risultati conclusivi. Ciò probabilmente a causa della elevata quantità di Co del campione che interferisce con le analisi.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] L. J. PEEL, « Biochem. J. », 88, 296 (1963).
- [2] H. DIEHL e R. MURIE, in « Iowa State J. Sci. », 26, 555 (1952).
- [3] J. W. DUBNOFF, « Biochem. Biophys. Res. Comm. », 16, 484 (1964).
- [4] N. ADLER, T. MEDWICK e T. J. POZNANSKI, « J. Am. Chem. Soc. », 88, 5018 (1966).
- [5] G. H. BEAVEN e E. A. JOHNSON, « Nature », 176, 1264 (1955).
- [6] D. CAVALLINI, R. SCANDURRA, E. BARBONI e M. MARCUCCI, « Febs Letters », 1, 272 (1968).